

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(開拓)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H05384・20K20390

研究課題名(和文)膵外分泌組織の再生と癌におけるミトコンドリアストレス誘発性SASP制御機構の解明

研究課題名(英文)Distinct regulatory mechanisms of mitochondrial stress induced SASP in pancreatic exocrine regeneration and cancer

研究代表者

川口 義弥(Yoshiya, Kawaguchi)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：60359792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,000,000円

研究成果の概要(和文)：組織立体構築の細胞コミュニティでは、構成細胞の挙動を統括する一定のルールが存在する。本研究では“再生と癌それぞれの細胞コミュニティ内での細胞挙動を統括するルールの違い”を理解し、新たな癌治療標的の端緒を得ることを目指した。細胞がストレスを受けると、自らは細胞老化に陥るが、特殊なタンパク質を分泌して周囲細胞に働きかける仕組み(SASPと呼ぶ)を持つ。マウス膵外分泌細胞にストレスを加えた結果、再生現象ではSASPが一過性に働いて臓器恒常性が保たれ、最終的にストレス細胞も除去されたが、膵外分泌細胞癌ではストレス細胞が長期に居座ってSASPが遷延する結果、癌の増大が促進されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウス膵外分泌細胞に対する2種類のミトコンドリアストレスにより、再生モデルと癌モデルに共通した分子によるSASPが惹起された。SASP分子に対する中和抗体やSASP下流シグナルの阻害化合物の投与により、癌腫進行が著明に阻害された。再生と癌でのSASP持続期間の違いは、PDL1発現による免疫回避機構活性化期間の違いが関与する可能性がある。以上の成果は、慢性炎症による癌進行メカニズムの責任分子解明に貢献しており、新たな治療ターゲットとなり得ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the cell community of three-dimensional organs, there exist rules that govern cell behavior. In this study, we aimed to get a clue to establish new therapeutic methods for pancreatic cancer by revealing the distinct rules in the cell community of pancreatic regeneration and cancer in mice. Senescence associated secretory phenotype (SASP) is an intercellular response mediated by the secreted proteins from the stress-induced senescent cells. We found that SASP is transiently activated and stimulated the proliferation of surrounding cells in the regeneration process after pancreatic acinar cellular stress, and stressed cells are gradually removed from the tissue. On the other hand, stressed cells were sustained and prolonged SASP accelerated tumor progression in murine oncogenic model.

研究分野：外科学 発生生物学

キーワード：SASP 膵癌 マウスモデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胎生期臓器形成では、複数の細胞種が互いに協調的に働く“細胞コミュニティー”を形成し、コミュニティー内の個々の細胞挙動が、複数の細胞間相互作用からなる一定のルールで統括されることで組織構築が完成する。では、「損傷を受けた組織構築が修復される再生現象や、組織構築が進行的に破壊される病態である癌において、それぞれの細胞コミュニティー内にはどのようなルールが存在するのだろうか?」という疑問が本研究の端緒であった。

立体構築の中の細胞間相互作用の一つとして、細胞がストレスを受けると、自らは細胞周期を停止させて細胞老化(Senescence)に陥ると同時に、種々のタンパク質を放出して周囲細胞の増殖を非自発的に刺激する現象(SASP: Senescence Associated Secretory Phenotype)を引き起こすことがショウジョウバエ eye disc を用いた研究で明らかとなっていた。SASP は障害臓器の組織構築再生過程では有利に働くと考えられるが、癌の増大による低酸素状態や、放射線照射・抗がん剤治療などのストレスで誘発される SASP は、ニッチ形成を伴う癌の進行/組織構築破壊の一因となり得ると考えた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、マウス膵腺房細胞特異的にミトコンドリアストレスを引き起こすことで SASP を誘発し、膵外分泌組織の再生と癌における SASP 制御機構の解明を目的とした。癌と再生を組織構築の破壊/修復という単純な観点で捉えることで、膵外分泌組織の再生と癌における SASP 制御機構の違いを解明することで、“再生と癌それぞれの細胞コミュニティー内での細胞挙動統括ルールの違い”を理解し、新たな癌治療標的の端緒を得ることを目指した。

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリアストレス-再生モデルマウスの作成

まず、ミトコンドリアストレス誘発方法を検討した。ラットに L-Lysine を腹腔内投与すると膵腺房細胞特異的なミトコンドリアストレスを誘発するという既報を参考に、マウスでの投与量を決定し、電子顕微鏡観察で確認した。このモデルは一過性のミトコンドリアストレスモデルであるが、どの細胞がストレスを受けているかの判定が光学顕微鏡観察でしづらいという欠点がある。そこで、Elastase-CreER を用いたタモキシフェン誘導性膵腺房細胞特異的 Pdx1 ノックアウトモデル(Pdx1cK0)と lineage tracing の併用で、ストレス細胞を周囲細胞の区別が可能となる実験モデルを作成し、電子顕微鏡及び組織学的解析を加えた。

上記2種類のミトコンドリアストレス誘発を“再生モデル”(L-Lys モデル、Pdx1cK0 モデル)とし、タモキシフェン誘導性 KrasG12D+Trp53R172H 発現による発癌シグナル発動にミトコンドリアストレスを加える“癌モデル”を以下の通り作成した。

(2) ミトコンドリアストレス-癌モデルマウスの作成

癌モデルではタモキシフェン誘導性に膵腺房細胞特異的 Pdx1 欠失によるミトコンドリアストレス誘発と同時に KrasG12D と Trp53^{R172H} を発現する ES 細胞と、タモキシフェンの影響を受けず常に EGFP 陽性である green 胎盤胞の膵癌キメラマウスを作成し、完全にストレス細胞と周囲細胞の区別が可能なモデル(EKP-Pdx1cK0)を作成した。加えて、Pdx1 欠失なしに KrasG12D と Trp53^{R172H} だけをタモキシフェン誘導性に発現させた後に L-Lysine を投与する癌モデル(Ly EKP-Pdx1WT)も作成した。

上記(1)再生モデル・(2)癌モデルでどのような SASP 現象が起こっているのか?を組織学的解析で検討した。

(3) マイクロアレイによる SASP 候補分子の抽出と実証

まず、ストレス細胞と正常細胞の区別が容易な EKP-Pdx1cK0 癌モデルと Pdx1cK0 再生モデルを使って、マイクロアレイ解析を行い SASP 候補分子を抽出した。その後、免疫組織染色を施行し、ストレス細胞での SASP 候補分子発現と周囲細胞での受容体発現を検証した。更に、周囲細胞での細胞内シグナル、生物学的反応に関して、免疫組織染色を中心とした解析を加えた。

以上の検討で抽出された SASP 候補分子とその下流シグナルを、中和抗体や阻害剤で阻害することで、実際の機能を検証した。

(4) SASP 制御機構の解明

再生と癌における SASP 活性およびその制御機構の共通点と相違点を解明するために、経時的組織解析、発現遺伝子解析ならびに SASP 阻害実験の効果を検証した。

4. 研究成果

(1) L-Lysine、Pdx1cK0 によるミトコンドリアストレスの特徴

まず、正常マウスに対する L-Lysine 投与量を決定した。このモデルでは投与 24 時間で形態異常を示すミトコンドリアが出現し、48 時間でマイトファジーが観察された。免疫染色では 24 時間後に senescence が起こり、1 週間後にはほぼ正常に回復していた。

Pdx1cK0 マウスのタモキシフェン投与 1 ヶ月目時点の観察で、電子顕微鏡上、クリステが少なく丸型の異常ミトコンドリア数が増え、小胞体内腔の拡張を認め、autophagosome 数も上昇していた。これらの所見は、ミトコンドリアストレスに加えて小胞体ストレス反応(UPR)の活性化を示唆している。ところが、proapoptotic マーカー:CHOP の発現量には有意差を認めず、電子顕微鏡上もクロマチン濃縮や核断片化など明らかなアポトーシスは示さず、TUNEL 陽性細胞の有意な上昇も認めなかった。lineage tracing により、Pdx1 ノックアウト細胞では Tom20 陽性の正常ミトコンドリアが減少したことから、電子顕微鏡での異常所見は Pdx1 ノックアウト細胞自身の変化だと考えられ、senescence に陥っていることを免疫組織染色で確認した。

また、EKP-Pdx1cK0、Ly EKP-Pdx1WT の 2 つの癌モデルにおいても、ミトコンドリアストレスによって細胞が senescence に陥ることを電子顕微鏡及び免疫組織染色解析で確認した。

(2) ミトコンドリアストレスによる組織反応

ミトコンドリアストレスが加わることによる周囲細胞の反応に着目して、それぞれのモデルマウスの組織学的解析を行なった。その結果、膵癌キメラマウス(EKP-Pdx1cK0)で、癌周囲の EGFP 陽性正常上皮細胞が細胞非自律的な増殖・異型化を来し、豊富な繊維化組織からなる癌ニッチ形成を伴って腫瘍増大が急速に促進されることを見出した。また、一過性のミトコンドリアストレスである L-Lys-EKP-Pdx1WT 癌モデルにおいても強い繊維化と急速な腫瘍増大が観察された。

一方、Pdx1cK0 再生モデルでは周囲細胞の増殖が一過性に活性化して組織量が一定に保たれるが、免疫細胞浸潤の程度は癌より軽度で、組織繊維化もほとんど見られなかった。L-Lysine 再生モデルでも一過性の細胞増殖活性の上昇を認めたが、繊維化は見られなかった。

(3) ミトコンドリアストレスによる CXCL13-YAP axis の活性化

具体的 SASP 分子の同定を目指し、Pdx1cK0 癌モデルの経時的マイクロアレイを行った。組織学的解析から、明らかな免疫細胞浸潤 / 組織繊維化を来す、ストレス誘導後 3 ヶ月目のマイクロアレイ解析では、様々なケモカインが発現上昇しており、いわゆるサイトカインストームの状況を示していた。ところが、それ以前の段階(ストレス誘導後 2 ヶ月目)では CXCL13 のみが発現上昇していることが分かった。そこで、免疫組織染色を行なったところ、ストレスを受けた癌細胞自身が CXCL13 を発現する事を見出し、SASP 責任分子の候補と考えた。周囲細胞に着目して解析を深めたところ、CXCL13 受容体である CXCR5 の発現が誘導され、下流シグナルとして YAP シグナルが活性化し、さらにその標的遺伝子 CTGF 発現が上昇することを突き止めた。極めて興味深いことに、ストレスが一過性であるはずの L-Lys-EKP-Pdx1WT 癌モデルにおいても CXCL13-YAP axis が持続的に活性化していることが観察された。

また、L-Lysine モデルと Pdx1cK0 モデルの再生モデル両方で、CXCL13-YAP axis が活性化され、組織構築修復の完成とともに活性化状態が消退する事も分かった。つまり、癌と再生では同じ分子を介した SASP が起こっており、膵再生モデルで一過性に活性化して組織修復に寄与する SASP シグナルが、膵癌モデルでは癌ニッチ形成を引き起こし、その活性化状態の遷延によって免疫細胞浸潤 / 組織繊維化が進行し、ニッチが成熟化することで癌進展 / 組織構築の破壊を加速度的に増悪させている可能性が高まった。

(4) 発癌シグナルの有無により SASP 持続期間の違いが生じるメカニズム

ストレスが一過性であるはずの L-Lys-EKP-Pdx1WT 癌モデルで CXCL13-YAP axis 活性化状態が遷延して癌が急速に進行した実験結果は、癌臨床での化学療法の無効化を考察する上で重要な糸口となる可能性がある。そこで、CXCL13 産生源であるストレス細胞自身がどうなったか? を電子顕微鏡観察で検討した。その結果、前述の通り発癌シグナルなしの L-Lysine 再生モデルでは、異常ミトコンドリアやマイトファジーは L-Lysine 投与後 24-48 時間で認め、1 週間後には存在しなかったのに対し、L-Lys-EKP-Pdx1WT 癌モデルでは 3 週間後でも異常細胞が存在することが分かった。この結果は、発癌シグナルによって ストレスからの回復が阻害されたか、 ストレス細胞が除去されずに居座っているかのどちらかの可能性を示唆するが、通常 senescence は回復しない不可逆的变化とされることから、上記のうち、 の可能性が高いと考えた。

そこで、PDX1cK0 モデルでの lineage tracing により、PDX1cK0 細胞数の割合の変化を調べたところ、再生モデルではタモキシフェン投与 1 ヶ月目時点では投与前と差はないが、3 ヶ月目になると明らかに組織から除去されている一方、癌モデルでは長期間にわたって組織中に居座っていることが分かった。

一般に senescence 細胞は免疫系による除去を受けると言われている。そこで、PDL1 による免疫回避機構について検討してみると、PDX1cK0 再生モデルではタモキシフェン投与 1 ヶ月目で PDL1 発現上昇、3 ヶ月目で低下パターンを示したが、EKP-Pdx1cK0 癌モデルでの PDL1 発現は 1 ヶ月目も 3 ヶ月目も同程度の発現上昇を示した。さらに L-Lysine 再生モデルでは投与後 24 時間で PDL1 発現が上昇し、1 週間でも高かったが、3 週目には低下した一方で、L-Lys-EKP-Pdx1WT 癌モデルでは、L-Lysine 投与後 1 週間、3 週間の両方で持続的 PDL1 発現上昇が確認された。上記全てのデータから、SASP 持続期間と PDL1 発現上昇期間には明らかな同調が見られたことから、発癌シグナルの有無による SASP 持続期間の違いは、PDL1 発現による免疫回避機構によって

説明される可能性が高いと考えた。

重要なことに、ミトコンドリアストレスを発動させない、コントロールとしての EKP-Pdx1WT 癌モデルでは PDL1 発現上昇が見られなかったことから、PDL1 は CXCL13-YAP axis の下流として発現誘導されていると考えた。

(5) CXCL13-YAP-PDL1 axis による SASP 活性化・制御機構

そこで発癌マウスに CXCL13 中和抗体または YAP 阻害剤を投与したところ、周囲正常細胞の増殖・異型化だけでなく、免疫細胞浸潤、組織繊維化と腫瘍全体の増大が著明に抑制された。YAP 阻害剤投与で PDL1 も低下したことは、確かに PDL1 が CXCL13-YAP axis によって制御されていることを示している。以上より、CXCL13-YAP-PDL1 axis を介した SASP 活性化・制御機構がミトコンドリアストレスによる癌ニッチ形成(免疫細胞浸潤 / 組織繊維化)と癌進展 / 組織構築の破壊の責任シグナルと結論された。

ヒト膀胱癌組織の解析でも P16 陽性 senescence 細胞、核内 YAP 陽性細胞、PDL1 陽性細胞を確認しており、CXCL13-YAP-PDL1 axis は有力な新規治療ターゲットとなり得ると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Nao Sankoda, Wataru Tanabe, Akito Tanaka, Hirofumi Shibata, Knut Woltjen, Tsutomu Chiba, Hironori Haga, Yoshiharu Sakai, Masaki Mandai, Takuya Yamamoto, Yasuhiro Yamada, Shinji Uemoto, and Yoshiya Kawaguchi	4. 巻 12
2. 論文標題 Epithelial expression of Gata4 and Sox2 regulates specification of the squamous-columnar junction via MAPK/ERK signaling in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-20906-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ben Sasaki, Shinji Uemoto and Yoshiya Kawaguchi	4. 巻 44
2. 論文標題 Transient FOXO1 inhibition in pancreatic endoderm promotes the generation of NGN3+ endocrine precursors from human iPSCs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2020.101754	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Horiguchi Masashi, Yoshida Masahiro, Hirata Koji, Furuyama Kenichiro, Masui Toshihiko, Uemoto Shinji, Kawaguchi Yoshiya	4. 巻 593
2. 論文標題 Senescence caused by inactivation of the homeodomain transcription factor Pdx1 in adult pancreatic acinar cells in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 2226 ~ 2234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13504	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakikubo M, Furuyama K, Horiguchi M, Hosokawa S, Aoyama Y, Tsuboi K, Goto T, Hirata K, Masui T, Dor Y, Fujiyama T, Hoshino M, Uemoto S, Kawaguchi Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 Ptf1a inactivation in adult pancreatic acinar cells causes apoptosis through activation of the endoplasmic reticulum stress pathway.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15812
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-34093-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hirata K, Kodama S, Nakano Y, Minaki-Nakagawa Y, Aoyama Y, Sakikubo M, Goto T, Yoshida M, Masui T, Yamamoto T, Uemoto S, Kawaguchi Y	4. 巻 9
2. 論文標題 Exocrine tissue-driven TFF2 prevents apoptotic cell death of endocrine lineage during pancreas organogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-38062-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shibata H, Komura S, Yamada Y, Sankoda N, Tanaka A, Ukai T, Kabata M, Sakurai S, Kuze B, Woltjen K, Haga H, Ito Y, Kawaguchi Y, Yamamoto T, Yamada Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 In vivo reprogramming drives Kras-induced cancer development	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 NATURE COMMUNICATIONS	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-04449-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 川口 義弥
2. 発表標題 隣立体構築における細胞間相互作用
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会WEB学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川口義弥
2. 発表標題 隣立体構築における細胞間相互作用
3. 学会等名 第119回日本外科学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口義弥
2. 発表標題 iPS細胞を用いた立体的膵組織の作成
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 膵内胚葉細胞の増殖を促進する方法及びキット	発明者 川口義弥, 佐々木勉	権利者 国立大学法人京都大学
産業財産権の種類、番号 特許、2021-005958	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 METHOD FOR PRODUCING PANCREATIC ENDOCRINE PRECURSOR CELL AND KIT FOR PRODUCING PANCREATIC ENDOCRINE PRECURSOR CELL	発明者 川口義弥, 佐々木勉	権利者 国立大学法人京都大学
産業財産権の種類、番号 特許、62/962,186	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	堀口 雅史 (Horiguchi Masashi)		
研究協力者	吉田 昌弘 (Yoshida Masahiro)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------

イスラエル	Hebrew University			
-------	-------------------	--	--	--